©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Einfluß der Zentrifugierung und chemischer Stoffe auf sich differenzierende Zellen von Micrasterias denticulata Bréb. mit besonderer Berücksichtigung des Golgi-Systems

Von CHRISTINE BURGSTALLER-GETZINGER und OSWALD KIERMAYER

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Salzburg)

Mit 17 Abbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung der mathem.-naturw. Klasse am 9. Oktober 1980 durch das W. M. FRIEDRICH EHRENDORFER)

1. Einleitung

Die einzellige Grünalge *Micrasterias denticulata* Bréb. wird wegen ihres phasenabhängigen Zellmusters, ihrer einfachen Kultivierbarkeit und wegen ihrer deutlich ausgebildeten Organellen vor allem auch der Dictyosomen als beliebtes Objekt für zellphysiologische Untersuchungen herangezogen.

Die Dictyosomenaktivität und -morphologie kann sowohl chemisch durch verschiedene Antibiotika – Cytochalasin B (MOLLENHAUER & MORRÉ 1975, 1976), Ethidiumbromid (HACKSTEIN-ANDERS 1974, 1975), Puromycin (ZERBAN 1974), Actinomycin D (HACKSTEIN-ANDERS 1974, ZERBAN 1974, TIPPIT & PICKETT-HEAPS 1974), Äthylalkohol und Diäthyläther (EXNER 1978) etc. als auch physikalisch durch Zentrifugation (DORDEL 1973, TIPPIT & PICKETT-HEAPS 1974) beeinträchtigt werden.

Zur vorliegenden Untersuchung wurden Actinomycin D und Streptomycin als chemische Parameter gewählt. Sie greifen in die Proteinsynthese und damit in die Determination des dictyosomalen Entwicklungs- und Reifungsprozesses ein.

Im Vergleich dazu verhindert oder stört die Zentrifugierung als physikalischer Faktor die Verteilung und Inkorporation von verschiedenen Vesikeln.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

2. Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden *Micrasterias denticulata* Bréb.-Zellen verwendet, die in WARIS-Nährlösung gehalten und nach der Lichtschockmethode von KIERMAYER (1970a) behandelt wurden.

Für jede einzelne Untersuchung wurden ca. 100 D–E Stadien (15minütige Entwicklungstabelle nach KIERMAYER 1970a) entnommen.

Die Zentrifugation erfolgte 4, 6 bzw. 9 Stunden bei 20 ± 1° C in einer Beckmann-Zentrifuge (Model J-21B Centrifuge) bei 12.000 UPM (= 16.743 g).

Actinomycin D wurde in einer Konzentration von 250 µg/ml Aqua bidest. bei 20° C angewendet. Die Behandlungsdauer betrug 7 bis 9 Stunden.

Streptomycin wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 20 µg/ml) bei konstanter Temperatur von 20° C und einer Dauer von 9 Stunden untersucht.

Nach der Zentrifugation bzw. der chemischen Behandlung wurde die eigentliche Fixierung im Fixomat der Balzers Union (TREIBLMAYER & POHLHAMMER 1974) nach der Kurzzeit-Fixierungsmethode von KIERMAYER (1970a) durchgeführt.

Die mit einem Diamantmesser median geschnittenen Objekte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert und mit einem AEI-Corinth 500 Elektronenmikroskop ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Zentrifugation

Neben der Verlagerung des Zellinhaltes entsprechend der Dichteunterschiede und der typischen Zellanomalien (DORDEL 1973, KIERMAYER & DORDEL 1976) wirkt sich die Zentrifugalkraft auch auf den Bau der einzelnen Organellen entsprechend der Wirkungsdauer aus.

3.1.1 Vierstündige Zentrifugation

Im zentrifugal verlagerten Chloroplasten findet man neben zahlreichen Pyrenoiden stark tubulär strukturierte Bereiche, die als mögliche Prolamellarkörper anzusprechen sind.

Im Cytoplasma fallen bei dieser Untersuchung besonders die membranbegrenzten Multivesikel-Komplexe auf. Es handelt sich um kreisförmige Strukturen mit sehr unterschiedlichen Inhalten, z. B. Ribosomen, verschiedene Vesikel, Mitochondrien usw.

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) weist bereits eine deutliche Volumszunahme auf, die bis zum Zerfall der Zisterne in einzelne ER-Vesikel fortschreiten kann, wie auf Abb. 1 und 4 ersichtlich ist.

Die Lagebeziehung des ER zu einem Dictyosom bzw. zum Chloroplasten ist noch weitestgehend erhalten.

Die Dictyosomen erfahren durch diese Behandlung noch keine Veränderung in ihrer Größe und Zisternenzahl sowie in ihrem typisch polaren Bau. Fallweise erscheint der interzisternale Raum besonders an der proximalen Seite erweitert. Die Vesikelabgabe beschränkt sich auf die Abschnürung von „flat-vesicles" (FV; KIERMAYER und DOBBERSTEIN 1973, Abb. 2), „dark-vesicles" (DV; KIERMAYER 1970a, b, Abb. 1 und 4) von den beiden letzten distalen Zisternen.

3.1.2 Sechsstündige Zentrifugation

Das gehäufte Auftreten von Multivesikel-Komplexen und Prolamellarkörpern kann nun nicht mehr beobachtet werden. Dagegen tritt die Verdickung und Vaskularisierung der ER-Zisternen immer deutlicher hervor (Abb. 3, 7). Besonders senkrecht zur Zentrifugationsrichtung liegendes ER vergrößert seinen Durchmesser um ein Vielfaches. Trotz der starken mechanischen Beanspruchung kann noch an vielen ER-Zisternen die Produktion von „X-vesicles" (VX; KIERMAYER 1977) festgestellt werden, was auf einen intakten Golgibildungsprozeß hindeutet. Allerdings sind auch viele Dictyosomen zu beobachten, die keine zugehörige ER-Zisterne mehr besitzen. Diese Dictyosomen sind stark degeneriert. Sie bestehen aus nur 3 bis 5 weit auseinanderliegenden, kurzen Zisternen, ihre Aktivität ist sehr eingeschränkt. Man findet nur wenige DV in ihrer Umgebung.

Wie schon DORDEL (1973) ausführte, bewirkt das Fehlen der ER-Zisterne und des Materialnachschubs in Form von VX, die entweder wegzentrifugiert oder aufgelöst wurden, eine Degeneration der Dictyosomen.

Bei jenen Dictyosomen, die ihre normale Gestalt und ihre Beziehung zu einer ER-Zisterne beibehalten haben, zeigt sich an der distalen Zisterne eine neue Aktivität, nämlich die Ausbildung von „coated vesicles" (CV; Abb. 7).

Dazu hebt sich die distale Zisterne leicht ab und bildet eine Ausbuchtung, die von einem diffusen „coat" überzogen ist.

Außer der CV-Bildung sind die Dictyosomen bei dieser Behandlungsmethode auch sonst noch sehr produktiv:

Neben dichten Ansammlungen von DV sind auch gruppenweise FV anzutreffen. Letztere sind gegenüber der üblichen Ausbildungsform

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

aufgebläht und sehr lang, was als Degenerationserscheinung zu deuten ist (DORDEL 1973). Nur wenige FV erreichen offenbar wegen des zentrifugalen Gegendruckes die Plasmamembran.

3.1.3 Neunstündige Zentrifugation

Das ER reagiert auf die langandauernde Zentrifugalkraft mit verschiedenen Ausbildungsformen entsprechend der Wirkungsrichtung: In der Nähe des Chloroplasten liegen parallel geschichtete ER-Membranen, während im Cytoplasma Bruchstücke von ER-Zisternen zu finden sind, die sich zu kurzen, sehr weitlumigen Stapeln reihen.

Im Unterschied zu den Dictyosomenstapeln besitzen sie keine Polarität und keinen Unterschied in der Zisternendicke. Der Ribosomenbesatz ist nur vereinzelt erkennbar. Die einem Dictyosom zugeordnete ER-Zisterne kann dick gedrungen sein wie in Abb. 8, 9 oder entsprechend der Kraftrichtung lanzettförmig an ihren Enden erweitert.

Die durch die Zentrifugalkraft offenbar bedingte Dehnung von Membranen greift bei dieser Behandlungsdauer von den ER-Zisternen auch auf die proximalen Dictyosomenzisternen über. Wiederum sind es die peripheren Zisternenabschnitte, die durch extreme Aufblähungen gezeichnet sind (Abb. 8, 9).

Sofern noch eine ER-Zisterne in Beziehung mit einem Golgi-Stapel steht, werden VX gebildet, so daß die Zisternenzahl erhalten bleibt, wie in Abb. 5 ersichtlich ist.

Die Aktivität des Stapels ist meist stark reduziert, was auf den großen Zisternenabständen beruhen kann.

Fallweise trifft man auf eine lange, distale Zisterne. Ihre abnorme Länge erklärt sich möglicherweise durch die fehlende Vesikelabgabe. In Abb. 5 ist die Bildung von FV noch deutlich zu erkennen, so daß in diesem Fall die distale Zisterne ihre übliche Länge beibehält.

Die auffälligste Deformation in allen drei gewählten Zentrifugationszeiten findet man an der distalen Stapelseite: Zuerst hebt sich die letzte Zisterne leicht ab, was an die Bildung von CV erinnert. Die kleine Ausstülpung erweitert sich und nimmt eine unregelmäßige Form an.

Auch die darunterliegenden Membranen zeigen Ausstülpungen (Abb. 1 bis 5). Schließlich entsteht ein unförmiges Gebilde aus konzentrisch liegenden Membranen, das an eine große „Blase" erinnert. In der Untersuchung kann keine bevorzugte Stelle für eine derartige Mißbildung gefunden werden. Die Deformation ist an jedem beliebigen Punkt auf der Zentralplatte des Stapels in der Ein- oder Mehrzahl anzutreffen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

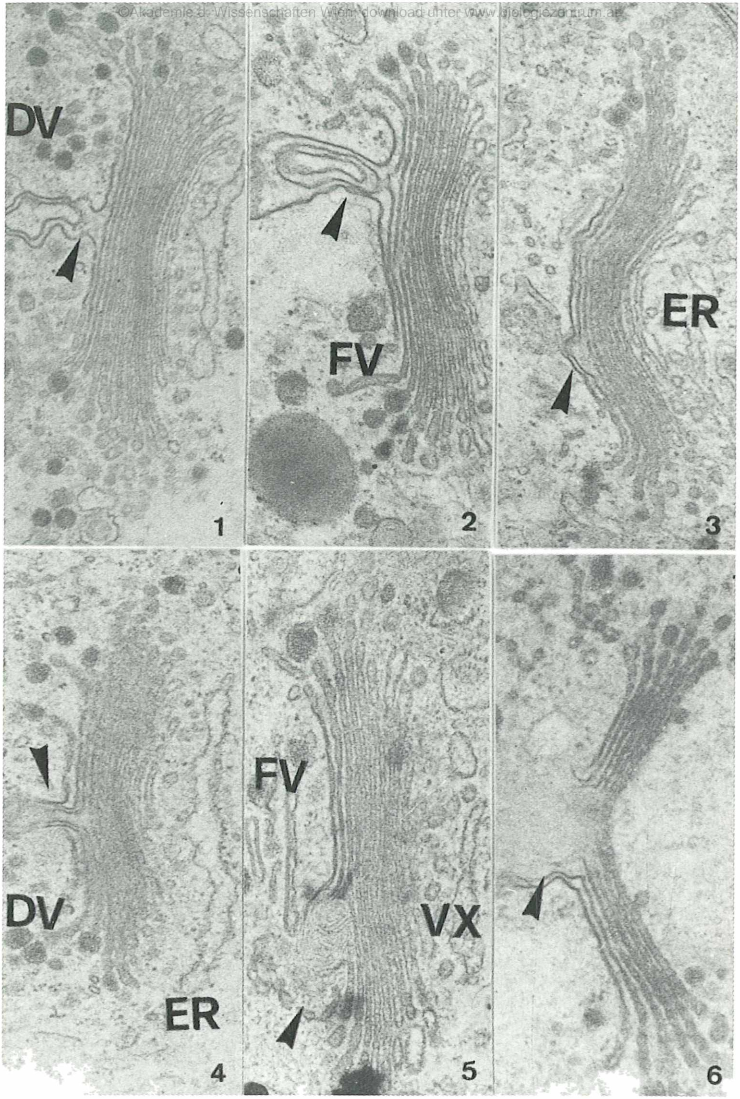
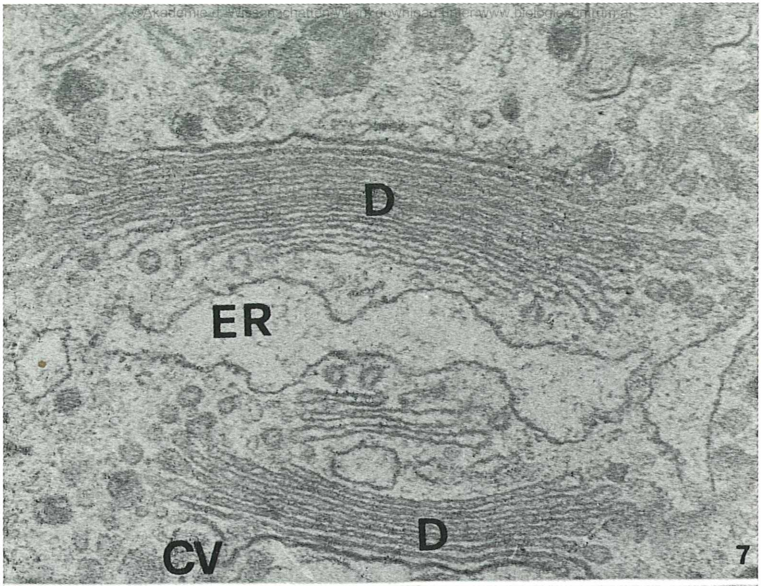


Abb. 1–6: 4stündige Zentrifugation (Abb. 1, 2, 4, 6); 6stündige Zentrifugation (Abb. 3); 9stündige Zentrifugation (Abb. 5): Verschiedene Phasen der „Blasenbildung" (Pfeile) nach Einwirken von Zentrifugalkräften. Vergr. 27.600x (Abb. 1), 32.000x (Abb. 2), 50.000x (Abb. 3), 24.000x (Abb. 4), 34.000x (Abb. 5), 38.400x (Abb. 6).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



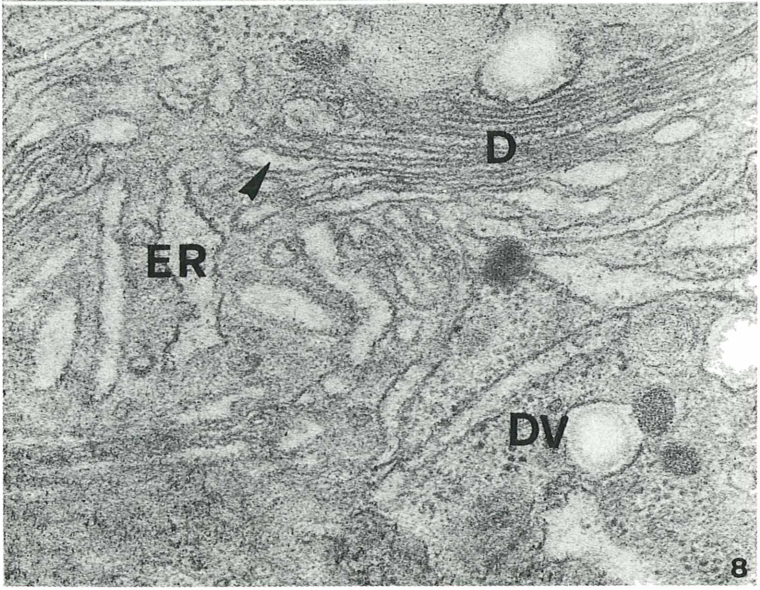


Abb. 7: 6stündige Zentrifugation: Zwei gegenüberliegende, CV-bildende Dictyosomen schließen eine dick aufgeblähte ER-Zisterne ein. Vergr. 46.800x.

Abb. 8: Nach 9stündiger Zentrifugation sind stark erweiterte ER- und Dictyosomen-Zisternen (Pfeile) zu beobachten. Vergr. 54.000x.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

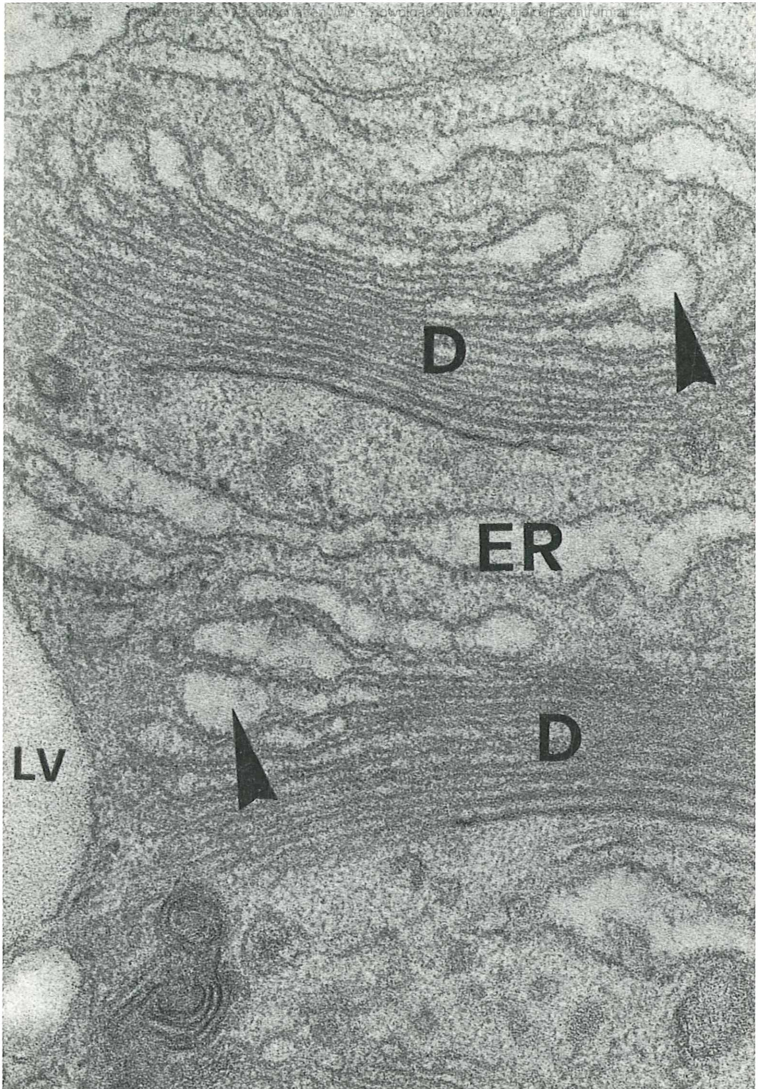


Abb. 9: Wie Abb. 8. Vergr. 74.000x.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

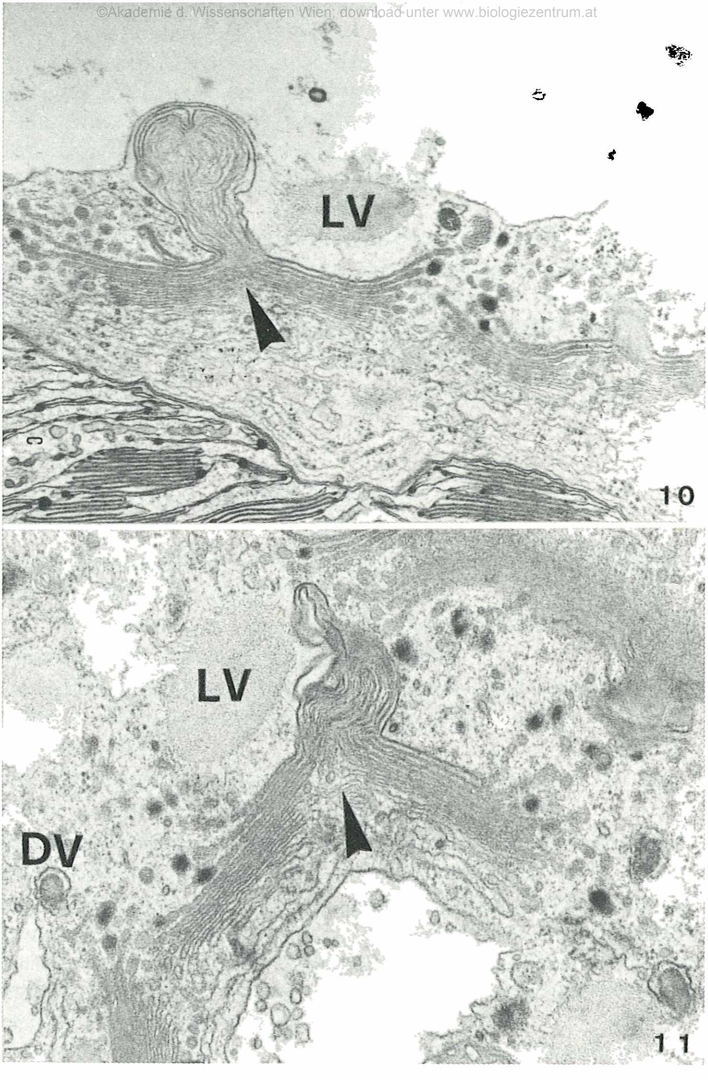


Abb. 10–11: 4stündige Zentrifugation: „Blasenbildungen“ am distalen Dictyosomenpol, die zur Teilung der Zisternen führen (Pfeile). Neben den „Blasen“ liegen „large vesicles“ (LV). Vergr. 10.000x (Abb. 10), 32.000x (Abb. 11).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die beteiligten Membranen sind nicht immer durchgehend sichtbar. Häufig treten Auflösungserscheinungen auf, bis schließlich eine diffuse Masse die Blase erfüllt. Oft ist auch die umgrenzende Membran in Auflösung begriffen, so daß es wie in Abb. 6 offenbar zum Ausfließen des Inhaltes kommt. Die Auflösungserscheinungen schreiten von distal nach proximal fort.

Die Abb. 1 bis 6 zeigen verschiedene Phasen der Blasenbildung, beginnend vom leichten Abheben der äußersten Zisterne bis zum Übergreifen auf die unterste proximale Zisterne. Daneben sind noch die einzelnen Stadien der Auflösung der Blasenmembranen zu beobachten, wobei als Ende der Zerfall des Stapels in zwei Teile anzusehen ist.

3.2 Actinomycin D (AMD)

Dieses Antibiotikum ist ein Transkriptionshemmer, indem es die Synthese von RNS an der DNS stört.

Die Auswirkungen der verschiedenen Konzentrationen und Behandlungszeiten unterscheiden sich kaum.

Die äußere Gestalt von *Micrasterias denticulata* weist stets deutliche Anomalien in der Lappenbildung auf (z. B. HACKSTEIN-ANDERS 1974, 1975; MEINDL 1981).

Die ER-Zisternen sind kaum noch vorhanden bzw. in kleine aufgeblähte Vesikel zerfallen.

Die Mitochondrien sind stark vergrößert und ihre Gestalt ist atypisch deformiert.

Die Wirkung auf die Dictyosomen beschränkt sich auf das Ablösen der distalen Zisterne, die meist in der Nähe des Stapels ringförmig geschlossen zu finden ist. Ansonsten ist die Zahl der Zisternen unverändert. Die Polarität ist trotz fehlender ER-Zisterne am unterschiedlichen Zisternenlumen zu erkennen.

Die sekretorische Aktivität ist durch das Antibiotikum ebenfalls beeinträchtigt. Die Bildung von DV und FV ist nur in bescheidenem Maß zu beobachten, dagegen ist die Abgliederung von CV vom distalen Pol stark aktiviert. Noch häufiger als bei den Zentrifugierungsversuchen tritt die Deformation des distalen Pols durch das Auswachsen der Membranen zu einer „Blase" in Erscheinung.

Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe steht die auffällige Vielzahl der Blasenbildungen an einem einzelnen Dictyosom.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

3.3 Streptomycin (SM)

Wie Actinomycin D, so ist auch Streptomycin ein Antibiotikum, das auf die Proteinsynthese Einfluß nimmt. Seine Wirkungsweise ist an vielen Anomalien der untersuchten Zellen zu erkennen.

3.3.1 Untersuchung mit 5 µg SM/ml:

Schon die abnorme Zellgestalt weist auf tiefgreifende Störungen hin. Primär- und Sekundärwand sind nur unregelmäßig und schmal ausgebildet.

Der Chloroplast besitzt spitz auslaufende Vorstülpungen und Anhäufungen von Grana an seinen Rändern. Zwischen diesen liegen einige Thylakoide. Im gesamten Chloroplasten trifft man auf „osmophile Granula", auf die schon DRAWERT & MIX (1961) hinwiesen. Besonders tiefgreifend sind die Veränderungen an den ER-Zisternen. Anstelle einer einzelnen periplastidären ER-Zisterne liegt ein breites ER-Band rund um den Chloroplasten. Die einzelnen Zisternen sind bezüglich Volumen und Länge ungleich ausgebildet, auch der Ribosomenbesatz ist völlig unregelmäßig.

Ebensolche Ansammlungen von Endoplasmatischem Retikulum findet man im Cytoplasma, wie Abb. 12 zeigt. Hier sind die Membranen besonders dicht mit Ribosomen besetzt.

Die Beziehung einer ER-Zisterne zu einem Dictyosom bleibt sehr selten erhalten. Häufig liegen nur einzelne, blasige ER-Fragmente am proximalen Dictyosomenpol. Da die Bildung von VX fehlt, ist damit wahrscheinlich das „steady state" der Dictyosomen unterbrochen.

Wie beim ER und den Mitochondrien fällt auch bei den Dictyosomen die ungewöhnliche Lage auf. Die Organellen sind nicht wie üblich um den Chloroplasten und den Kern orientiert, sondern sammeln sich genau wie die anderen Zellbestandteile in lokal begrenzten, homogenen Gruppen im Cytoplasma an.

Die Polarität der Dictyosomen kann durch die verschiedenen Querschnitte der Zisternen leicht geklärt werden. Allerdings ist die weitlumige, proximale Zisterne nicht wie in unbehandelten Zellen als tubuläres Netzwerk (MENGE & KIERMAYER 1977), sondern durchgehend ausgebildet.

Die Vesikelproduktion ist stark eingeschränkt. FV werden kaum gebildet, CV können überhaupt keine gefunden werden, nur DV verschiedener Populationen, die wahrscheinlich Reifungsstadien entsprechen, werden abgegliedert.

Besonders zahlreich liegen „large vesicles“ (LV; KIERMAYER 1970 a, b) in der Umgebung der Dictyosomen (Abb. 10, 11, 13). Ihr in Vergleich zu den Zisternen riesiger Durchmesser deutet auf die hypertrophierende Wirkung des Antibiotikums hin.

Die Größe und die Zisternenzahl der Dictyosomen werden durch SM dieser Konzentration kaum beeinträchtigt. Allerdings ist die Gestalt durch intensive Blasenbildung (Abb. 10, 11, 13) stark deformiert. Von dieser Störung sind in vielen Fällen, wie die Abbildungen 10, 11 und 13 beweisen, alle Zisternen des Stapels betroffen, so daß die Blasenbildung scheinbar als Teilungsfaktor für ein Dictyosom fungiert, was auf der Abb. 10 und 11 besonders deutlich wahrzunehmen ist.

Bei den drei Abbildungen 10, 11 und 13 ist auch auf die lokale Nähe der LV zu den Blasenbildungen hinzuweisen.

3.3.2 Untersuchung mit 10 μg SM/ml:

Die Degenerationserscheinungen schreiten bei dieser Konzentration weiter fort. Die dichte Ansammlung von ER-Zisternen läßt sich nicht mehr feststellen, im Gegenteil, die Membranen der Zisternen erscheinen in Auflösung begriffen (Abb. 14). Auch der Zusammenhalt der Polyribosomen ist gestört, so daß nur vereinzelt Ribosomen im Plasma liegen. Das Cytoplasma selbst ist völlig destrukturiert und scheint sich aufzulösen. Die Wirkung auf die Dictyosomen entspricht den von DRAWERT & MIX (1961) gegebenen Beschreibungen. Demnach setzt ein proximal beginnender Zerfall ein, der offenbar auf das Fehlen der ER-Zisterne zurückzuführen ist.

Die Aktivität der Dictyosomen ändert sich erheblich im Vergleich zur niedrigeren Konzentration von SM. Im Gegensatz zu dieser tritt nämlich die Bildung von CV am gesamten distalen Pol auf, wobei die Zahl der gleichzeitig gebildeten Vesikel von Stapel zu Stapel unterschiedlich ist, wie die Zusammenstellung der Abbildungen 14, 15, 16 und 17 veranschaulicht. Neben der Produktion von CV bilden die Golgi-Zisternen an ihrer Peripherie kleine „dunkle Vesikel“

Gleich wie bei der angewendeten Konzentration von 5 μg SM/ml ist auch bei dieser Versuchsreihe die Anhäufung von LV festzustellen (Abb. 16), ebenso wie die verstärkte Störung des distalen Pols durch Blasenbildungen (Abb. 15).

Die Blasen können in verschiedener Anzahl über die gesamte Zentralplatte verstreut liegen. Der Grad der Auflösung sowie die Zahl der betroffenen Zisternen sind bei den einzelnen Dictyosomen unterschiedlich.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

3.3.3 Untersuchung mit 20 µg SM/ml:

Diese SM-Konzentration zerstört die gesamte Zellorganisation. Das destrukturierte Plasma beschränkt sich auf große „Vesikel" mit schaumigem Inhalt, während große Zellbereiche entleert sind. Der Kerninhalt ist zum Teil aufgelöst, die Mitochondrien fehlen völlig, die ER-Membranen und Ribosomen sind ebenfalls verschwunden, als Dictyosomenreste können – allerdings unter Vorbehalt – einzelne, unregelmäßige Zisternen gedeutet werden.

4. Diskussion

4.1 Beeinträchtigung der Dictyosomenverteilung

Auf die Änderung der Lage der Dictyosomen im Laufe der Entwicklung der Alge hat schon KIERMAYER (1970a) hingewiesen. Durch die Zentrifugation wird die Lage kaum beeinflußt. Auch DORDEL (1975) bestätigte, daß die Dictyosomen ihre Position um den Kern nicht verlassen.

Auch die Anwendung von 250 µg AMD/ml verursacht keine Verlagerung der Dictyosomen (HACKSTEIN-ANDERS 1974).

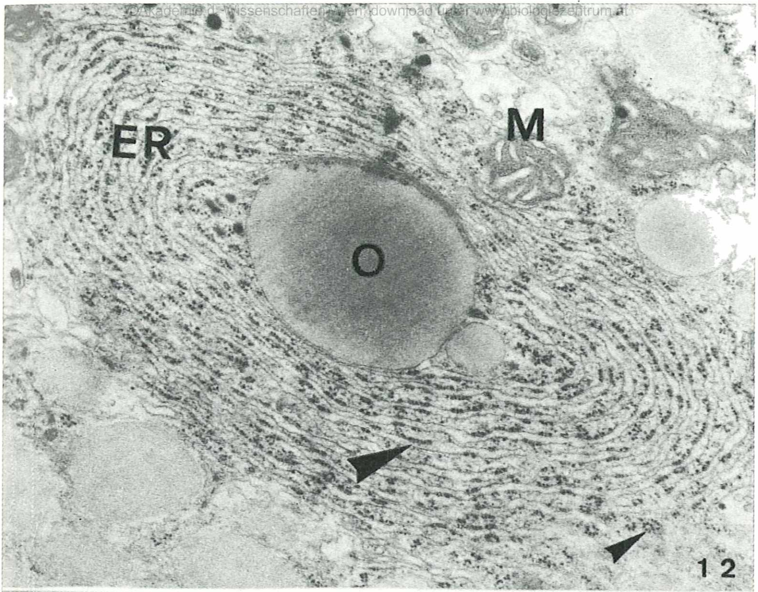
Im Gegensatz dazu greift SM in die Verteilung des Golgi-Apparates ein. Die Stapel liegen nicht wie üblich um den Chloroplasten, sondern konzentrieren sich auf lokal begrenzte Bereiche des Cytoplasmas. Es wäre denkbar, daß mit der Störung der Chloroplastenstruktur ein „Bindungsmechanismus" zwischen ihm und den Dictyosomen zerstört wird. Vielleicht ist eine intakte periplastidäre ER-Zisterne das verantwortliche Bindeglied. Nach der SM-Aufnahme vergrößert sie sich zu einem dicken, bezüglich VX-Bildung inaktiven ER-Band. In der Weise deformiert verliert sie offenbar die funktionelle Bedeutung für die Dictyosomen.

4.2 Änderung der Dictyosomenform

Die Polarität eines Golgi-Stapels – gegeben durch eine VX bildende ER-Zisterne, angrenzende konvexe und sekretorisch inaktive proximale Zisternen und abschließende distale, schmale und konkav gekrümmte Zisternen, die Vesikel abgliedern – wird durch die angewendeten Methoden nie völlig gestört. Distaler und proximaler Pol können noch auf Grund der unterschiedlichen Zisternenweite definiert werden.

Im Unterschied zu DORDEL (1973), die bereits nach dreistündiger Zentrifugationsdauer das Fehlen der ER-Zisternen feststellte, ist dies in der vorliegenden Untersuchung erst nach sechs Stunden zu beobachten.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



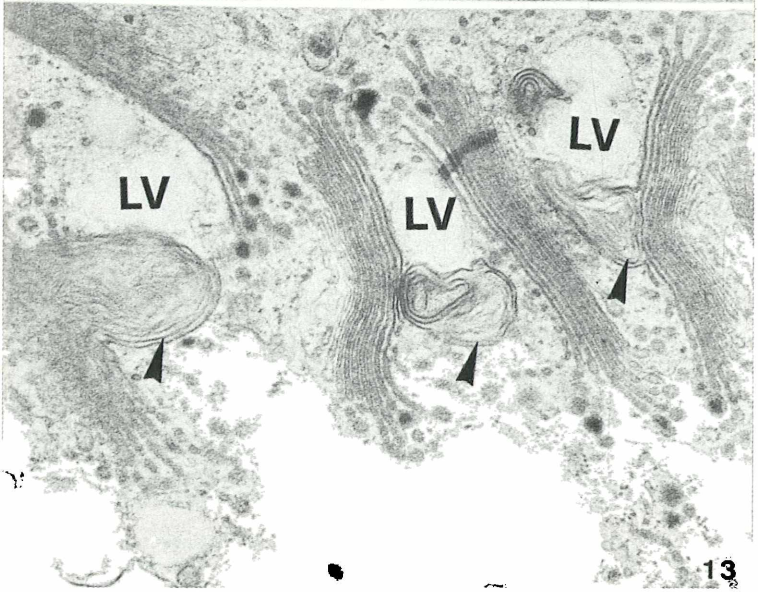


Abb. 12: 5 µg SM/ml: Viele ER-Zisternen mit dichtem Ribosomenbesatz (großer Pfeil) umschließen ein „oil-body" (O); spiralig angeordnete Polysomen (kleiner Pfeil). Vergr. 20.000x.

Abb. 13: Durch 5 µg SM/ml hervorgerufene große, mehr oder minder stark aufgelöste Blasen (Pfeile). In ihrer Nähe treten „large vesicles" (LV) auf. Vergr. 25.600x.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

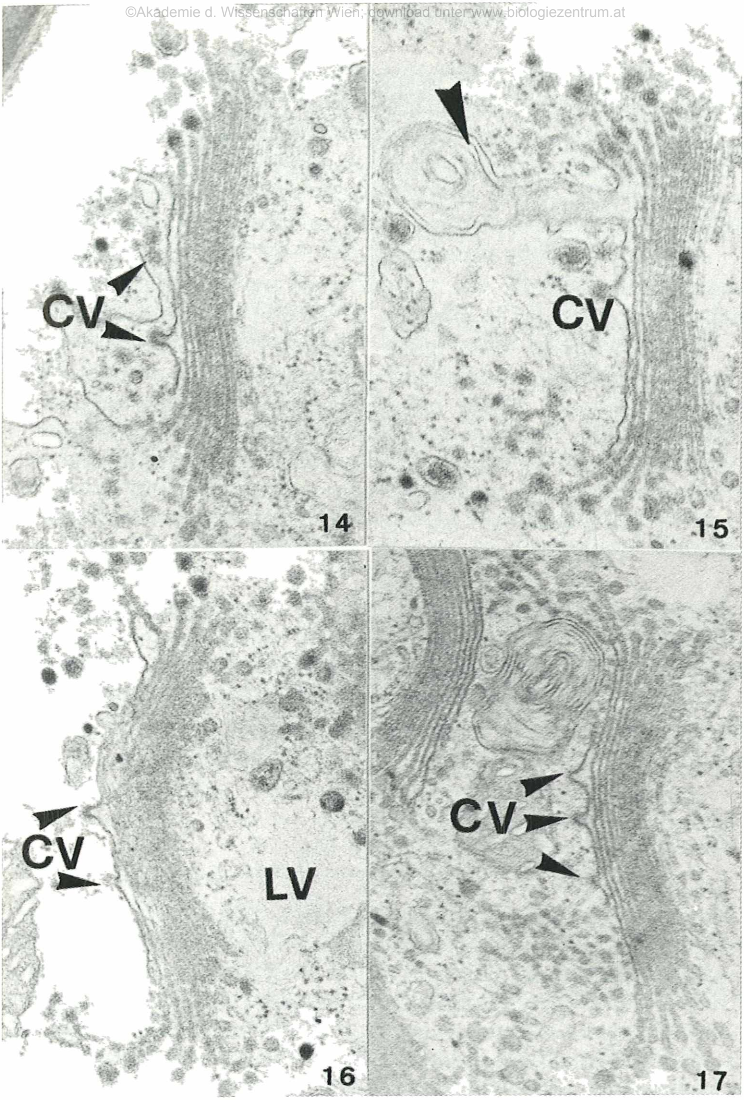


Abb. 14–17: Zusammenstellung von Dictyosomen, die nach Behandlung mit 10 µg SM/ml distal „coated vesicles" (CV) in verschiedener Anzahl ausbilden. Abb. 15 weist zusätzlich noch eine Blasendeformation auf (Pfeil). Vergr. 27.200x (Abb. 14), 40.000x (Abb. 15), 30.000x (Abb. 16), 28.800x (Abb. 17).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Eine vollkommene Krümmung der distalen Zisterne, die zum völligen Umschließen der proximalen Zisternen führt, kann im Gegensatz zu DORDEL nie beobachtet werden.

Hingegen mag der Grund für das Nichtübereinstimmen mit den AMD-Versuchen von HACKSTEIN-ANDERS (1974), die birnenförmige Dictyosomen beschrieb, auf das Weglassen von DMSO zurückzuführen sein, wodurch möglicherweise die Permeation verringert wurde.

Über den Einfluß von Streptomycin auf die Dictyosomen gibt es kaum Literaturhinweise. DRAWERT und MIX (1961) merkten an, daß die Dictyosomen durch Auflösung der Membranen zerfallen.

Dies kann in der vorliegenden Untersuchung bei Verwendung von 20 µg SM/ml bestätigt werden, da bei dieser Konzentration keine Dictyosomen mehr festzustellen sind, abgesehen von einigen undifferenzierten, lamellenartigen Gebilden. Bei 5 µg SM/ml ist ein deformiertes ER-Fragment bei den Dictyosomen erkennbar. Die proximale Zisterne ist durchgehend ausgebildet und entspricht wahrscheinlich der zweiten Zisterne. Das Netzwerk der ersten Zisterne ist durch diese Behandlung degeneriert.

Bei 10 µg SM/ml treten weitere Auflösungserscheinungen auf, die von der proximalen Seite ihren Anfang nehmen. Die Ursache ist möglicherweise die fehlende ER-Zisterne, die für die Gesamtorganisation des Stapels eine bedeutende Rolle spielen dürfte.

Die Dictyosomen verhalten sich demnach bei einer SM-Behandlung konträr zur AMD-Behandlung, bei der die Auflösung distal durch Vesikelabgabe erfolgt.

4.3 Änderung der Zisternenausbildung

Schon DORDEL (1973) weist in ihren Zentrifugationsergebnissen auf erweiterte Zisternendurchmesser hin. In dieser Untersuchung tritt häufig ein vergrößerter interzisternaler Raum zwischen den proximal gelegenen Zisternen auf. Durch die fehlende ER-Zisterne ist der Materialnachschub gestört, was sich auch auf den Zisternenzusammenhalt auswirken dürfte. Da sich zuerst die proximalen Zisternen lösen, kann ein Reifungsprozeß des interzisternalen Raumes bzw. eine Festigung der Zisternen in Richtung des distalen Poles angenommen werden.

Nach neunstündiger Zentrifugation reagieren die Dictyosomen dieser Versuchsreihe ähnlich wie die ER-Zisternen nach kürzerer Versuchsdauer: Entsprechend der Kraftrichtung blähen sich die Zisternen auf. Besonders an der Zisternenperipherie ist eine enorme Volumsvergrößerung zu beobachten. Der Inhalt der Dictyosomenzisternen dürfte

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

wesentlich fester sein als jener der ER-Zisternen, da die Dictyosomen erst nach längerer Krafteinwirkung reagieren.

Da die deformierten Zisternen nur proximal zu finden sind, kann auf mögliche Membranunterschiede zwischen den beiden Stapelpolen geschlossen werden.

Schon NORTHCOTE (1971) verwies auf Membranähnlichkeiten zwischen dem ER und den proximalen Golgi-Zisternen. Das kann hiemit durch ihre gleiche Reaktion auf die Zentrifugation belegt werden.

Die Ergebnisse von FLICKINGER (1968, 1971), ZERBAN (1974) und HACKSTEIN-ANDERS (1974), die bei ihren AMD-Versuchen Dictyosomen teils mit verringerter Größe und Zisternenzahl, teils mit dreifachem Normaldurchmesser und teils mit aberranter birnenförmiger Gestalt beschrieben, können mit dieser Untersuchung nicht generell bestätigt werden. Der Grund ist vielleicht in den unterschiedlichen osmotischen Bedingungen der einzelnen Versuchanordnungen zu suchen. Allerdings kann die distale Zisterne als abgelöstes, kreisförmiges Gebilde beobachtet werden.

Während – wie oben beschrieben wurde – die Zentrifugation den Zusammenhalt der proximalen Zisternen mechanisch lockert, greift AMD chemisch in die Bindung der distalen Zisterne ein. Da AMD die Proteinsynthese stört, könnten Proteine für den Zusammenhalt verantwortlich sein. Auch Streptomycin lockert die Bindung zwischen den einzelnen Zisternen.

Bei 5 μg SM/ml fehlt die erste Zisterne. Bei höherer Konzentration schreitet die Auflösung weiter nach distal vor, bis schließlich bei 20 μg SM/ml keine eindeutig erkennbaren Zisternen mehr vorhanden sind. Die Auflösung hat sicherlich ihre grundsätzliche Ursache im fehlenden ER.

Die auffälligste Störung der normalen Stapelform ist die sich am distalen Pol vorwölbende ,,Blase". Sie tritt bei allen gewählten Untersuchungen auf. Ausdehnung, Intensität und Anzahl sind völlig unterschiedlich.

Zuerst hebt sich die distale Zisterne leicht ab, was durch Quellung des interzisternalen Materials bedingt sein könnte. Der gewölbte Teil wird weiter ausgedehnt bzw. wächst selber weiter, die darunterliegenden Zisternen werden möglicherweise durch Druck ebenfalls zum Abheben und Auswachsen aktiviert, so daß die Membranen konzentrisch ineinander geschichtet liegen.

Die häufig zu beobachtenden Auflösungen innerhalb der Blase können mit dieser Untersuchung nicht genau definiert werden. Es kann sich um lytische Erscheinungen, aber auch um das Platzen überdehnter Membranen handeln.

Die Blasenbildung stellt vielleicht eine Reaktion auf geänderte Druckverhältnisse im Stapel dar, die möglicherweise durch unkorrelierte VX-Bildung und Vesikelabgliederung entstehen. Es handelt sich also um eine pathologische Erscheinung, durch die sich das Dictyosom gleichsam ein Ventil als Druckausgleich schafft.

Da an einigen Dictyosomen die Blasenbildung auch auf den proximalen Pol übergreift und nach der Blasenauflösung zwei Dictyosomenteile vorliegen, könnte die Blase auch als Teilungsmechanismus angesehen werden. Allerdings fehlt diesen Dictyosomen das ER und daher erscheint die Vermehrung inaktiver Stapel wenig sinnvoll.

Effizienter scheint der von KIERMAYER (1970a) beschriebene Teilungsvorgang zu sein, der auf einem proximal beginnenden Brechen des Stapels beruht, sobald er eine Länge von 5 µm erreicht hat. So ist die Durchschnittslänge von 2,5 µm bei den Dictyosomen von *Micrasterias denticulata* gewährleistet.

UEDA & NOGUCHI (1976) diskutieren einen Teilungsmechanismus, der durch lytische Enzyme von Lysosomen ausgelöst wird. Dabei scheint der Teilungsort völlig dem Zufall überlassen zu sein.

Da die Blasenbildung bei allen gewählten Behandlungsmethoden auftritt, ergibt sich die Frage, ob die Blase eine allgemeine Reaktion auf sich verschlechterndes Milieu darstellt, oder ob es sich möglicherweise um eine kulturbedingte Aberration handelt. Alle diese Aspekte bezüglich der Blasenbildung bedürfen noch einer eingehenden Klärung.

4.4 Änderung der sekretorischen Aktivität

Bei sechsstündiger Zentrifugation treten Anhäufungen von F-Vesikeln auf, die die von DORDEL (1973) beschriebenen Degenerationserscheinungen zeigen. Sie sind teils länger, teils kürzer ausgebildet, die sackartigen Ausstülpungen sind selten erkennbar, die Globuli sind nicht deutlich ausgebildet und die Membranen sind weit gedehnt.

Die zentrale Ansammlung demonstriert, daß die Vesikel ihr Ziel wegen des herrschenden Druckes nicht erreichen, so daß die atypische Zellform hervorgerufen wird.

Nach neunstündiger Zentrifugation stagniert die Bildung von „flat vesicles" und „dark vesicles", wahrscheinlich bedingt durch die gestörte ER-Golgi-Beziehung. Aus diesem Grunde tritt oft eine ungewöhnlich lange, distale Zisterne auf.

Bei AMD und SM ist auch eine Einschränkung der Vesikelproduktion zu beobachten. Ähnlich wie bei HACKSTEIN-ANDERS (1974) sind FV und DV zu erkennen, wobei letztere in zwei verschiedenen Populationen auftreten.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Bei 5 µg SM/ml fallen besonders große, eiförmige „large vesicles" auf. Da ihr Durchmesser oft größer ist als der des Stapels, kann man eine hypertrophierende Wirkung von Streptomycin vermuten. Die LV konnten in dieser Untersuchung nie während der Abgliederung beobachtet werden, so daß man annehmen kann, daß sie schon vor der Behandlung abgeschnürt, und ihr Transport sowie ihre Entleerung durch das Antibiotikum behindert wurden.

Bei sechs- und neunstündiger Zentrifugation, 250 µg AMD/ml und 10 µg SM/ml fällt neben der Blasenbildung noch eine weitere ungewöhnliche Aktivität der distalen Zisterne auf: COLE & WYNNE (1973) und HACKSTEIN-ANDERS (1974) beschrieben derartige „Austreibungen" als „coated vesicles" Die distale Zisterne besitzt auf der gesamten Oberfläche die Potenz zur CV-Bildung.

FV und CV sind die einzigen Vesikel, die nicht von der Zisternenperipherie gebildet werden. Sie entstehen direkt aus der distalen Zisterne.

Da die Bildung der CV während der Normogenese sehr selten erwähnt wird, liegt die Vermutung einer pathologischen Fehlentwicklung nahe.

Micrasterias denticulata Bréb. reagiert sowohl auf physikalische als auch auf chemische Störungen mit der Bildung von CV. Diese Reaktion ist daher nicht als spezifisch zu betrachten, sondern als Folge der Milieuverschlechterung. Da die CV so zahlreich auftreten, dienen sie eventuell dem raschen Abbau geschädigter und gealterter Dictyosomen.

5. Zusammenfassung

In dieser Untersuchung werden die jungen Entwicklungsstadien von *Micrasterias denticulata* Bréb. elektronenmikroskopisch untersucht, nachdem sie physikalischen und chemischen Manipulationen unterworfen wurden. Der Schwerpunkt liegt auf den Modifikationen der Dictyosomen.

5.1 Zentrifugation

Die Zellen wurden 4, 6 und 9 Stunden lang mit 12.000 UpM zentrifugiert. Der Zellinhalt ist entsprechend der Dichte geschichtet. Im Cytoplasma liegen besonders bei vierstündiger Zentrifugation viele „multi-vesicle-bodies", im Chloroplast treten häufig Prolamellarkörper auf. Der Zerfall des ER schreitet bei längerdauernder Zentrifugation fort.

Die Dictyosomenzahl wird bei fehlender ER-Zisterne verringert. Die Zisternen liegen weiter auseinander. Bei 6stündiger Zentrifugation treten Ansammlungen von degenerierten FV auf.

Bei neunstündiger Zentrifugation ist der proximale Pol genauso deformiert wie die ER-Zisterne, was den Schluß auf eine Membranähnlichkeit beider Strukturen zuläßt. Die oft sichtbare lange Zisterne wird mit der eingeschränkten Vesikelproduktion erklärt.

Der distale Pol ist in den meisten Fällen durch die Bildung von CV oder durch das Auswachsen der Zisternen zu „Blasen" gezeichnet.

5.2 Actinomycin D

Zwischen den gewählten Behandlungszeiten von 7 und 9 Stunden mit 250 µg AMD/ml sind kaum Unterschiede zu beobachten.

Die Zahl der Dictyosomenzisternen ist unverändert, allerdings liegt die distale Zisterne meist losgelöst in der Nähe des Stapels. Die ER-Zisterne fehlt meist, was die eingeschränkte FV- und DV-Bildung erklären könnte. Dagegen ist der distale Pol sehr aktiv und bildet zahlreiche CV und „Blasen"

5.3 Streptomycin

Durch 5 µg SM/ml ist die Formbildung der Alge ähnlich wie durch AMD gestört.

Der Chloroplast besitzt periphere Anhäufungen von Grana. Das ER liegt in breiten Bändern um den Chloroplast oder im Plasma angehäuft.

Auch die Dictyosomen treten gesammelt in bestimmten Plasmabereichen auf. Diese Ansammlungen sind bei höheren Konzentrationen nicht mehr festzustellen.

Die sekretorische Aktivität ist stark eingeschränkt, aber viele hypertrophe LV liegen in der Nähe des Stapels.

Die distale Zisterne zeichnet sich wiederum durch „Blasenbildung" und CV-Abschnürung aus.

Diese Bildungen treten auch bei 10 µg SM/ml auf, obwohl bereits eine proximal beginnende Degeneration einsetzt. Bei einer Konzentration von 20 µg SM/ml ist das Cytoplasma völlig destrukturiert, und die einzelnen Organellen sind nicht mehr unterscheidbar.

Die Arbeit wurde vom Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (Projekt 3660) gefördert.

Literatur

COLE, G. T. & WYNNE, M. J., 1973: Nuclear pore arrangement and structure of the Golgi complex in Ochromonas danica (Chrysophyceae). Cytobios 8, 161–173.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

DORDEL, S., 1973: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Einfluß der Zentrifugalkraft auf Micrasterias dent. Bréb. Dissertation, Köln.

DRAWERT, H. & MIX, M., 1961: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. VI. Mitteilung: Der Einfluß von Antibiotica auf die Chloroplastenstruktur bei Micrasterias rotata. Planta 57, 51–70.

EXNER, C., 1978: Der Einfluß von Äthylalkohol und Diäthyläther auf Micrasterias. Dissertation, Salzburg.

FLICKINGER, C. J., 1968: Cytoplasmic alterations in Amoeba proteus with Actinomycin D. A comparison with the effects of surgical enucleation. Exp. Cell Res. 53, 241–251.

FLICKINGER, C. J., 1971: Decreased formation of Golgi bodies in amebae in the presence of RNA and protein synthesis inhibitors. J. Cell Biol. 49, 221–226.

HACKSTEIN-ANDERS, C., 1974: Untersuchungen zur Wirkung von Actinomycin D und Ethidiumbromid auf die Cytomorphogenese und Ultrastruktur von Micrasterias thomasiana und Micrasterias denticulata Bréb. unter besonderer Berücksichtigung des Golgi-Apparates. Dissertation, Köln.

HACKSTEIN-ANDERS, C., 1975: Untersuchungen zur Cytomorphogenese von Micrasterias thomasiana und Micrasterias denticulata Bréb. unter Einfluß von Actinomycin D und Ethidiumbromid. 1. Lichtmikroskopische Untersuchungen. Protoplasma 59, 76–132.

KIERMAYER, O., 1970a: Elektronenmikroskopische Untersuchung zum Problem der Cytomorphogenese von Micrasterias denticulata Bréb. I. Allgemeiner Überblick. Protoplasma 69, 97–132.

KIERMAYER, O., 1970b: Causal aspects of cytomorphogenesis in Micrasterias. Annals of the New York Academy of Science 175, 626–701.

KIERMAYER, O., 1977: Biomembranen als Träger morphogenetischer Information. Untersuchungen bei der Grünalge Micrasterias. Naturwiss. Rundschau 30, 161–165.

KIERMAYER, O. & DOBBERSTEIN, B., 1973: Membrankomplexe dictyosomaler Herkunft als „Matrizen" für die extraplasmatische Synthese und Orientierung von Mikrofibrillen. Protoplasma 77, 437–451.

KIERMAYER, O. & DORDEL, S., 1976: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Cytomorphogenese von Micrasterias denticulata Bréb. II. Einfluß von Vitalzentrifugierung auf Formbildung und Feinstruktur. Protoplasma 87, 179–190.

MEINDL, Ursula, 1981: Störung der Cytomorphogenese durch Hemmung der Proteinsynthese bei Micrasterias denticulata (Desmidiaceae). Publ. Inst. f. d. Wiss. Film, Göttingen (in Druck).

MENGE, U. & KIERMAYER, O., 1977: Beobachtungen zur Struktur der Dictyosomen von Micrasterias denticulata Bréb. Mikroskopie 33, 168–176.

MOLLENHAUER, H. H. & MORRÉ, D. J., 1975: Effects of Cytochalasin B on the Golgi Apparatus of Maize Root Cells. 33rd Am. Proc. Electron Micr. Soc. Amer.

MOLLENHAUER, H. H. & MORRÉ, D. J., 1976: Transition elements between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in plant cells. Cytobiol. 13, 297–306.

NORTHCOTE, D. H., 1971: Der Golgi-Apparat. Endeavour 30, 26–33.

TIPPIT, D. H. & PICKETT-HEAPS, J. D., 1974: Experimental investigations into morphogenesis in Micrasterias. Protoplasma 81, 271–296.

TREIBELMAYER, K. & POHLHAMMER, K., 1974: Die Verwendung eines Mikrofiltergerätes bei der Fixierung und Entwässerung kleiner biologischer Objekte in der Elektronenmikroskopie. Mikroskopie 30, 229–233.

UEDA, K. & NOGUCHI, T., 1976: Transformation of Golgi apparatus in the cell cycle of a green alga Micrasterias americana. Protoplasma 87, 147–162.

ZERBAN, H., 1974: Verhalten von Struktur und Funktion der Dictyosomen bei Acetabularia unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Dissertation, Berlin.

ABKÜRZUNGEN

AMD	Actinomycin D
CV	„coated vesicle", C-Vesikel
D	Dictyosom
DV	„dark vesicle", D-Vesikel
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FV	„flat vesicle", F-Vesikel
LV	„large vesicle", L-Vesikel, Schleimvesikel
M	Mitochondrium
O	„oil-body", Ölkörper
SM	Streptomycin
VX	X-Vesikel